

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT DARI EKSTRAK  
ETANOL 50% DAUN MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) DENGAN  
METODE DPPH SERTA PENETAPAN KADAR FENOL TOTAL**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHYL ACETATE FRACTION OF  
BLACK MULBERRY LEAF ETHANOL 50% EXTRACT USING DPPH  
METHOD AND DETERMINATION OF TOTAL PHENOL CONTENT**

**Zainab<sup>1</sup>, Amalia Hanifti Choirunisa<sup>2</sup>**

1,2 Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta  
Jalan Prof. Dr. Soepomo, Janturan, Warungboto, Yogyakarta 55164  
[zainab@pharm.uad.ac.id](mailto:zainab@pharm.uad.ac.id), [amaliahanifti@gmail.com](mailto:amaliahanifti@gmail.com)

**ABSTRAK**

Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) mengandung senyawa aktif fenol dan flavonoid. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan daun Murbei Hitam pada fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 50% dengan metode DPPH serta menentukan kadar fenolik total.

Daun murbei hitam diekstraksi menggunakan etanol 50%, ekstrak kental yang sudah difraksi dengan etil asetat dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan asam galat sebagai pembanding. Konsentrasi asam galat yang digunakan adalah 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, dan 3,0 µg/ml. Konsentrasi sampel fraksi etil asetat daun murbei hitam untuk uji antioksidan adalah 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/ml. Penetapan kadar fenol total dengan metode *Folin-Ciocalteu* asam galat digunakan sebagai standar penetapan kadar fenol dengan konsentrasi 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 µg/ml. Besarnya nilai aktivitas antioksidan dapat dinyatakan dengan  $ES_{50}$ . Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*.

Hasil penelitian aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun murbei hitam dengan metode DPPH menunjukkan bahwa kelompok standar asam galat memiliki potensi antioksidan kuat terhadap radikal bebas DPPH dengan harga  $ES_{50}$  sebesar  $2,186 \pm 0,014$  µg/ml dan kelompok sampel fraksi etil asetat memiliki potensi aktivitas antioksidan sedang terhadap radikal bebas DPPH dengan nilai  $ES_{50}$  sebesar  $233,45 \pm 2,354$  µg/ml. Penetapan kadar fenol total fraksi etil asetat daun murbei hitam memiliki kadar fenol total sebesar  $14,35 \pm 0,09$  mg GAE/g fraksi.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan dapat dikatakan bahwa potensi aktivitas antioksidan berdasarkan metode DPPH fraksi etil asetat lebih kecil dibandingkan dengan asam galat.

**Kata kunci: Antioksidan, Fraksi, Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.), Metode DPPH, Fenol Total**

### ABSTRACT

*Black Mulberry Leaf (Morus nigra L.) contains phenol and flavonoid active compounds. As an antioxidant phenol compound contained in mulberry leaves will bind to free radicals and reduce oxidative stress levels. The purpose of this study was to determine the antioxidant activity of Black Mulberry leaves in the ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract by DPPH method and determine the total phenolic content.*

*Antioxidant activity of ethyl acetate fraction of black mulberry leaves was tested and gallic acid used as a comparison. Gallic acid concentrations used were 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, and 3,0 µg/ml. The fraction sample concentrations for antioxidant testing were 100, 200, 300, 400, and 500 µg/ml. Determination of total phenol levels Folin-Ciocalteu method Gallic acid was used as a standard with concentrations of 30, 40, 50, 60, 70, and 80 µg/ml. The amount of antioxidant activity expressed with  $ES_{50}$ . The data were analyzed with the One Way ANOVA test with a 95% confidence level followed by the Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test.*

*The results of the antioxidant activity of black mulberry leaf ethyl acetate fraction showed that the gallic acid standard group had a strong antioxidant potential with an  $ES_{50}$  value of  $2.186 \pm 0.014$  µg/ml and the group of ethyl acetate fraction had the potential for moderate antioxidant activity with an  $ES_{50}$  value of  $233.45 \pm 2.354$  µg/ml. Determination of the total phenol content had a total phenol content of  $14.35 \pm 0.09$  mg GAE/g fraction.*

*Based on the results of the antioxidant activity test it can be said that the potential antioxidant activity of the ethyl acetate fraction compared to gallic acid standards is.*

**Keyword : Antioxidant, Fraction, Black Mulberry Leaf (Morus nigra L.), DPPH method, Total Phenol**

### PENDAHULUAN

Antioksidan secara istilah merupakan suatu molekul yang memiliki kemampuan menstabilkan atau menon-aktifkan suatu radikal bebas yang akan menyerang sel. Beberapa penelitian telah menyebutkan bahwa semakin seringnya penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas. Salah satu penyakit yang disebabkan radikal bebas adalah penyakit degeneratif. Penyakit degeneratif adalah penyakit yang menyebabkan kecacatan, kematian, serta mudahnya terserang penyakit secara prematur. Contohnya adalah penyakit kardiovaskular, diabetes melitus, kanker dan penyakit paru obstruksi kronis.

Radikal bebas merupakan salah satu penyebab kanker dan penyakit degeneratif lain. Penyakit kanker dan penyakit degeneratif dapat diredam apabila tubuh memiliki penangkap radikal bebas. Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat laju oksidasi molekul lain atau senyawa kimia yang menyumbangkan satu atau lebih elektron untuk radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam (Hernani dan Raharjo, 2005).

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas suatu senyawa yang diuji menggunakan radikal stabil. Adanya penangkapan radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan kemudian menyebabkan penghilangan

warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, 2005). Penelitian yang telah dilakukan oleh (Yiğit *et al.*, 2008) pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan persen penangkapan radikal DPPH pada ekstrak metanol daun murbei hitam sebesar 45,5%.

Senyawa fenol sebagai salah satu zat aktif diukur menggunakan spektrofotometri sinar tampak dengan metode *Folin Ciocalteu*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Souza *et al.*, 2018) kandungan senyawa fenol total yang terdapat pada daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) sebesar  $153,00 \pm 11,34$  mg GAE/ g ekstrak etil asetat. Daun murbei hitam memiliki kandungan senyawa fenol seperti asam galat dan asam klorogenat yang memiliki peran sebagai metabolit sekunder yang memiliki banyak manfaat (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini digunakan fraksi etil asetat daun murbei hitam dari ekstrak etanol 50% daun murbei hitam. Etil asetat digunakan sebagai pelarut fraksinasi karena bersifat semipolar sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat semipolar yaitu senyawa fenol dan flavonoid. Pada industri farmasi pelarut yang layak digunakan adalah pelarut universal yaitu air, etanol, atau campuran keduanya. Hal ini melatarbelakangi pengujian aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% pada daun murbei hitam.

## METODE PENELITIAN

### A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol 50% daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dan untuk mengetahui kadar fenol total sebagai senyawa aktif dalam fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 50% daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dengan metode *Folin Ciocalteu* termasuk jenis penelitian non eksperimental.

### B. Sampel

Sample yang digunakan adalah daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) yang diperoleh dari Desa Kepek, Kecamatan Pengasih, Kulon Progo, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan 18 November 2018.

### C. Bahan dan Alat yang digunakan

#### 1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) yang diperoleh dari Kulon Progo, etanol 50%, etil asetat, kloroform (*merck*), aquades, DPPH (*sigma aldrich*), reagen *Folin Ciocalteu p.a.(merck)*, metanol *p.a.(merck)*, asam galat *p.a.*, NaOH (*merck*).

#### 2. Alat

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas (*iwaki*), neraca analitik Ohaus, pompa vacum, corong *Buchner*, alat *rotary evaporator*, corong pisah, mikropipet 1000  $\mu$ l (*socorex*), kertas saring, propipet, pipet volume (*iwaki*), pipet tetes, spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV-1800), aluminium foil.

## **D. Prosedur Penelitian**

### **1. Identifikasi tanaman**

Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA UAD. Tanaman murbei hitam yang didapatkan dari Kepek, Kulon Progo diambil bagian daunnya kemudian dilakukan identifikasi tanaman berdasarkan *Flora Of Java* (Becker dan Van der brick, 1956) untuk mengetahui kebenaran tanaman tersebut.

#### **a. Pemeriksaan makroskopis**

Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan bagian tanaman secara visual oleh mata. Pemeriksaan makroskopis meliputi pemeriksaan bentuk, warna, tekstur, dan karakteristik daun (Anonim, 2011).

#### **b. Pemeriksaan mikroskopis**

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan pada daun segar dan kering pada penampang melintang dan membujur dengan ditambahkan larutan kloralhidrat dan dilihat menggunakan mikroskop (Anonim, 2011).

### **2. Pembuatan Simplisia**

Daun Murbei Hitam yang sudah bersih dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C sampai daun yang basah menjadi kering dan kaku. Setelah daun murbei kering, dihaluskan menggunakan mesin penggiling dan diayak pada ayakan mesh 20/40.

### **3. Pembuatan Ekstrak dan Fraksinasi**

Simplisia yang sudah jadi diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 50% dengan perbandingan simplisia dan volume pelarut (1 : 9), kemudian simplisia dimaserasi selama 18 jam dan remaserasi 3x dengan pelarut yang sama. Setelah 3 kali maserasi dilakukan penyaringan pada ekstrak. Semua filtrat yang didapat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 70-80°C hingga diperoleh konsistensi ekstrak cair yang agak kental yang dipanaskan di atas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental dilarutkan dengan aquades 25 ml suhu 50°C ditambahkan kloroform 25 ml dan difraksinasi sebanyak 3 kali hingga kedua campuran terpisah. Larutan yang tidak larut kloroform difraksinasi dengan menambahkan 25 ml etil asetat dan difraksinasi hingga kedua larutan terpisah. Fraksi etil asetat yang didapat kemudian diuapkan di atas *waterbath* hingga didapatkan fraksi kental.

### **4. Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak**

#### **a. Organoleptis**

Pengujian organoleptis meliputi pemeriksaan terhadap warna, rasa, bau, dan konsistensi ekstrak hasil ekstraksi. Pemeriksaan terhadap warna ekstrak dilakukan dengan mengamati warna ekstrak dibawah lampu dengan cahaya putih dan terang. Pemeriksaan terhadap bau ekstrak dilakukan dengan meremas sedikit ekstrak dengan ibu jari dan jari telunjuk dan dikibas-kibaskan di sekitar hidung. Tentukan kekuatan bau (tidak ada, lemah, khas, kuat) Uji konsistensi dengan menyentuh sample ekstrak lembut atau keras (Anonim, 2011).

#### **b. Rendemen Ekstrak**

Rendemen ekstrak daun murbei dihitung dengan membandingkan bobot awal simplisia dengan bobot akhir ekstrak yang dihasilkan (Anonim, 2000). Rumus menghitung rendemen ekstrak :

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot awal simplisia}}{\text{bobot ekstrak}} \times 100\%$$

Rendemen fraksi etil asetat dihitung dengan membandingkan bobot ekstrak yang dipakai dengan bobot fraksi yang didapatkan.

$$\% \text{ Rendemen fraksi} = \frac{\text{bobot awal ekstrak}}{\text{bobot fraksi}} \times 100\%$$

### c. Susut pengeringan

Penentuan susut pengeringan dilakukan dengan cara ekstrak daun murbei hitam sebanyak 1 gram diletakkan pada lempeng aluminium foil (khusus) kemudian dimasukkan kedalam alat *Halogen Moisture Analyzer* dengan suhu 105°C selama 15 menit. Susut pengeringan memenuhi syarat apabila nilai persen susut pengeringan yang diperoleh <10% (Salamah & Widyasari, 2015).

## 5. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan

Larutan uji dengan konsentrasi 1% dibuat dengan menimbang 500 mg fraksi dilarutkan dalam 50 ml metanol. Larutan direaksikan pada tabung reaksi dengan mencampur 2 ml larutan DPPH 0,15 mM ditambahkan dengan 2 ml larutan uji. Hasil positif terdapat aktivitas antioksidan ditandai dengan adanya perubahan warna ungu menjadi kuning setelah ditambahkan larutan uji.

## 6. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH

### a. Pembuatan larutan DPPH

Ditimbang seksama lebih kurang 10,0 mg serbuk DPPH (BM = 394,32), dilarutkan dengan metanol (p.a.) hingga batas 10,0 ml, larutan diambil 3 ml, ditambahkan metanol p.a. hingga tanda batas 50,0 ml (DPPH 0,15mM).

### b. Penentuan *Operating Time* (OT)

Sebanyak 1,0 ml larutan DPPH 0,15mM dipipet, dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan metanol p.a. sebanyak 1,0 ml. Larutan dicampur homogen dan diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-90 menit pada panjang gelombang 517 nm. Sedangkan untuk larutan fraksi dan larutan asam galat, masing-masing diambil 1,0 ml dan ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH 0,15mM dicampur hingga homogen, kemudian diukur absorbansinya dalam rentang waktu 0-5400 menit pada panjang gelombang 517 nm.

### c. Penentuan $\lambda$ max

Sebanyak 1,0 ml larutan DPPH 0,15mM dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan metanol p.a. sebanyak 1,0 ml di gojog hingga homogen, kemudian diinkubasi dalam ruang gelap dan diukur dalam rentang waktu OT. Tentukan spektrum serapan nya pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel.

### d. Pembuatan Larutan Uji

Sejumlah 50,0 mg fraksi etil asetat dilarutkan dalam 50 ml metanol p.a. sebagai larutan induk (1 mg/ml), kemudian larutan induk tersebut dibuat lagi dalam berbagai konsentrasi yaitu 100,200,300,400, dan 500 µg/ml.

### e. Pembuatan kontrol negatif

Kontrol negatif dibuat dengan 1,0 ml metanol p.a. ditambah 1,0 ml larutan pereaksi DPPH 0,15mM.

### f. Pembuatan kontrol positif

Kontrol positif dibuat dengan cara melarutkan 10,0 mg asam galat dalam 100,0 ml metanol p.a. dari larutan tersebut dibuat larutan dengan konsentrasi 1,4 µg/ml, 1,8 µg/ml, 2,2 µg/ml, 2,6 µg/ml, dan 3 µg/ml.

**g. Pengukuran Absorbansi Larutan Uji**

Masing – masing 1,0 ml larutan uji dan larutan pembanding dengan berbagai konsentrasi direaksikan dengan 1,0 ml larutan DPPH 0,15mM. Campuran larutan tersebut disimpan ditempat gelap selama OT. Kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang serapan maksimal DPPH dengan spektrofotometri UV-Visibel, sebagai blanko digunakan metanol p.a. dan larutan uji pada masing-masing konsentrasi.

**7. Uji kualitatif Fenol**

Sebanyak 4 ml fraksi etil asetat daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) ditambah 10 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%, apabila terbentuk warna merah, ungu, biru, atau hitam pekat dan warna hijau menunjukkan hasil positif mengandung fenol (Setiabudi & Tukiran, 2017).

**8. Penetapan Kadar Fenol Total (Anonim, 2011)**

**a. Penentuan *Operating Time* (OT)**

Sebanyak 1,0 ml larutan asam galat konsentrasi 50 µg/ml ditambah 5 ml reagen *Folin Ciocalteau* 7,5%, kemudian digojog dan didiamkan selama 8 menit, ke dalam larutan tersebut ditambah 4 ml larutan NaOH 10%, digojog homogen. Ukur OT selama 5400 detik pada panjang gelombang 730 nm.

**b. Penentuan panjang gelombang Serapan Maksimum**

Sebanyak 1,0 ml larutan asam galat konsentrasi 50 µg/ml ditambah 5 ml reagen *Folin Ciocalteau* 7,5%, kemudian digojog dan didiamkan selama 8 menit, ke dalam larutan tersebut ditambah 4 ml larutan NaOH 10%, digojog homogen, dan didiamkan pada suhu kamar selama 1 jam, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 400-800 nm.

**c. Pembuatan kurva baku asam galat**

Sebanyak 1,0 ml larutan asam galat konsentrasi 30, 40, 50, 60, 70, dan 80 µg/ml masing-masing dimasukkan dalam flakon, kemudian ditambah 5 ml reagen *Folin Ciocalteau* 7,5% dan digojog. Setelah didiamkan selama 8 menit, masing-masing larutan ditambah 4 ml larutan NaOH 10% digojog homogen, dan didiamkan selama *operating time* pada suhu kamar. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang absorbansi maksimum, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (µg/ml) dengan absorbansi.

**d. Pengukuran kadar fenol total**

Sebanyak 100,0 mg fraksi etil asetat dilarutkan sampai volume 10,0 ml dengan metanol. Larutan diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 4 mg/ml. Larutan fraksi yang diperoleh dipipet 1,0 ml dan ditambah 5 ml reagen *Folin-Ciocalteau* (7,5%) dan digojog, didiamkan selama 8 menit, ditambah 4 ml larutan NaOH 10% dan didiamkan lagi pada range operating time pada suhu kamar. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang absorbansi maksimum. Pengujian dilakukan 5 kali pengulangan.

**F. Analisis Data**

**1. Aktivitas Antioksidan**

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Penangkapan} = \frac{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

Semakin besar persentase penangkapan, maka semakin kuat kemampuan penangkapan radikal bebas. Kemudian % penangkapan dan konsentrasi senyawa uji diregresi linier untuk mendapatkan konsentrasi penangkapan radikal sebesar 50% (ES<sub>50</sub>).

*Effective Scavenging* 50% merupakan konsentrasi sampel yang dapat menangkap radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai ES<sub>50</sub> diperoleh dari nilai x setelah menggantikan nilai y = 50 pada persamaan regresi linier antara % penangkapan dengan konsentrasi senyawa uji. Persamaan regresi linier

$$y = Bx + A$$

Keterangan :

y = % aktivitas antioksidan

x = konsentrasi senyawa uji (μg/ml)

A = *intersept*

B = *slope*

Data yang diperoleh dari hasil penangkapan radikal bebas dianalisis secara uji statistika dengan software SPSS.

## 2. Kadar Fenol Total

Senyawa antioksidan pada umumnya mengandung senyawa fenolik. Oleh karena itu, masing-masing konsentrasi ekstrak perlu diketahui kadar fenol total untuk dapat diketahui potensi aktivitas antioksidan suatu tanaman (Arfan *et al.*, 2012).

Data yang diperoleh dengan pembanding berupa asam galat kemudian di regresi linier dengan persamaan  $y = bx + a$  dibuat berdasarkan data absorbansi dan konsentrasi larutan standar (Alfian & Susanti, 2012).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Identifikasi Tanaman

#### a. Determinasi tanaman

Hasil determinasi tanaman murbei hitam adalah sebagai berikut :

1b-2b-3b-4b-6b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27b-799b-800a Moraceae

1b-2b-4b-6b-8b-9a-11b-12b Morus

(*Morus nigra* L.).

#### a. Pemeriksaan Makroskopik

Jenis daun murbei hitam yaitu daun tunggal, warna daun hijau, bentuk daun bundar telur, pangkal daun berbentuk hati, ujung daun berbentuk lancip, tepi daun bergerigi, permukaan daun berbulu, tulang daun menyirip, percabangan daun selang-seling, panjang helaian daun  $15,95 \pm 0,25$  cm dan lebar helaian daun  $9,25 \pm 0,43$  cm.

#### b. Pemeriksaan Mikroskopik

Hasil identifikasi simplisia daun murbei hitam didapatkan sel litosis, pada potongan membujur daun murbei hitam terdapat stomata dan sel epidermis, pada potongan melintang daun murbei hitam terdapat rambut penutup, rambut kelenjar,

berkas pembuluh, dan hablur kalsium oksalat bentuk roset, hablur kalsium oksalat bentuk prisma), dan pada serbuk daun murbei hitam terdapat parenkim.

### **1. Penyiapan Bahan Utama**

Daun yang sudah dicuci, ditiriskan, diangin-anginkan dan dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam, tujuan digunakan kain hitam agar daun tidak terpapar oleh sinar matahari secara langsung yang dapat mengakibatkan senyawa aktif yang terkandung didalamnya akan rusak. Kemudian daun dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C. Proses pengeringan dilakukan sampai daun murbei hitam kering dan mudah diremas. Daun murbei hitam yang telah kering dan bisa diremas, dihaluskan dengan menggunakan blender agar partikel menjadi lebih kecil sehingga penyarian akan berlangsung optimal.

### **2. Pembuatan Ekstrak dan Fraksi**

Serbuk daun murbei hitam kering sebanyak 600 gram diekstraksi menggunakan pelarut etanol 50% sebanyak 5,4 L dengan cara maserasi. Setelah jadi ekstrak kental maka dilakukan fraksinasi dengan 25 ml kloroform kemudian dengan 25 ml etil asetat.

### **3. Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak**

#### **a. Organoleptis**

Hasil organoleptis ekstrak etanol daun murbei hitam untuk uji warna dihasilkan warna hijau tua dibawah sinar matahari. Ekstrak etanol daun murbei hitam memiliki kekuatan bau yang khas dan sensasi bau aromatis. Sedangkan untuk uji konsistensi atau tekstur ekstrak daun murbei hitam memiliki konsistensi yang lembut.

#### **b. Penetapan Rendemen**

Bobot awal simplisia yang ditimbang sebesar 600 gram, sedangkan bobot akhir ekstrak yang dihasilkan sebesar 79,1318 gram. Berdasarkan perhitungan % rendemen ekstrak tersebut, maka % rendemen ekstrak yang diperoleh sebesar 13,17 %. Bobot awal ekstrak yang digunakan adalah 10 gram dan bobot akhir fraksi adalah 1,0697 sehingga didapatkan rendemen 10,70 %

#### **c. Penetapan susut pengeringan**






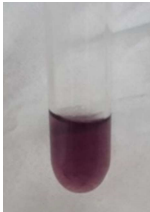
Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *Halogen Moisture Analyzer*. Rata-rata susut pengeringan ekstrak etanol daun murbei hitam diperoleh sebesar  $4,44 \pm 0,108\%$ . Dengan demikian susut pengeringan ekstrak etanol daun murbei hitam dinyatakan telah memenuhi persyaratan atau kurang dari 10%.

### **E. Uji kualitatif kandungan antioksidan fraksi**

Pengujian kualitatif kandungan antioksidan pada fraksi bertujuan untuk mendeteksi adanya aktivitas antioksidan dalam fraksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna pada larutan reagen DPPH ketika ditambahkan dengan larutan fraksi etil asetat daun murbei hitam. Perubahan warna yang terjadi yaitu dari warna larutan DPPH berwarna ungu akan berubah menjadi warna kuning pucat setelah ditambahkan dengan larutan sampel. Terjadinya perubahan warna pada larutan DPPH karena adanya reaksi antara senyawa radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yang tereduksi oleh senyawa antioksidan sehingga menurunkan intensitas warna larutan DPPH.



**Tabel I.** Uji pendahuluan antioksidan

Sample	Sebelum ditambah DPPH	Sesudah ditambah DPPH	Keterangan
Asam galat			Hasil positif terjadi perubahan warna dari jernih menjadi kuning
Fraksi			Hasil positif terjadi perubahan menjadi warna kuning
Metanol			Hasil negatif larutan berwarna ungu (DPPH tidak tereduksi)

#### F. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH, DPPH merupakan senyawa radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yang memiliki elektron bebas yang dapat berikatan dengan senyawa hidrogen pada senyawa antioksidan. Prinsip dari metode DPPH yaitu terjadinya pengurangan radikal bebas yang stabil DPPH. Radikal bebas DPPH dengan elektron bebas tidak berpasangan memberikan warna ungu memberikan serapan maksimum pada 515-517 nm (Salamah & Widyasari, 2015).

Metode DPPH dipilih sebagai metode pengukuran aktivitas antioksidan karena metode yang sederhana, mudah, untuk penapisan aktivitas penangkapan radikal beberapa senyawa, efektif, dan praktis. Uji aktivitas antioksidan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visible karena bersifat sangat sensitif, yaitu memiliki kemampuan mendeteksi kadar suatu senyawa yang sangat kecil, dan dapat membaca senyawa berwarna yang disebabkan adanya gugus kromofor.

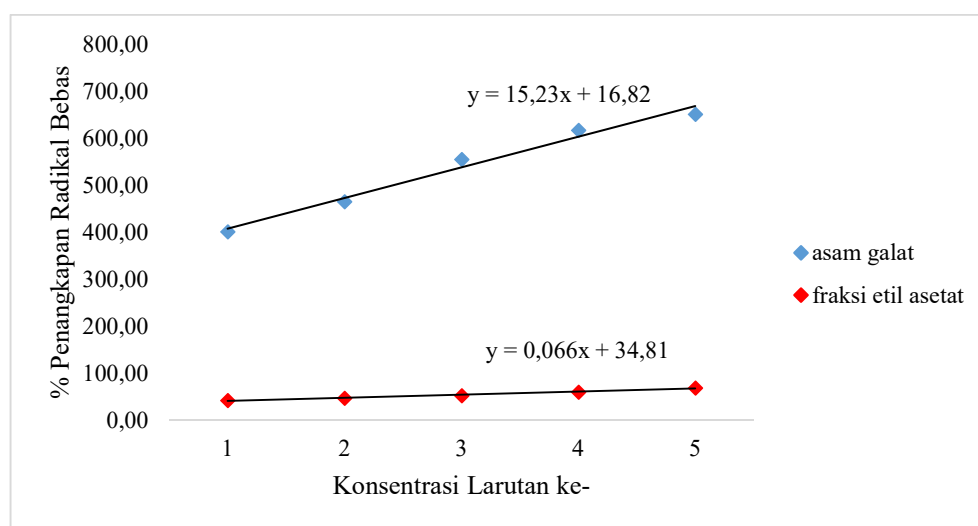
##### 1. Penentuan *Opetating Time* (OT)

Hasil pengukuran OT yang dilakukan pada larutan standar asam galat diperoleh pada menit ke- 52 sampai menit ke-62, sedangkan pada larutan uji fraksi etil asetat daun murbei hitam waktu operasional diperoleh pada menit ke- 40 sampai menit ke- 42.

[illegible]

**Tabel II.** Hasil ES<sub>50</sub> Fraksi Etil Asetat Daun Murbei Hitam

% Penangkapan radikal bebas	Konsentrasi (µg/ml)					Persamaan regresi $Y = bx + a$	ES <sub>50</sub> (µg/ml)
	100	200	300	400	500		
R1	42,26	46,68	53,55	59,84	68,57	$y=0,066x+34,45$ $r = 0,9941$	236,46
R2	42,26	48,80	52,97	61,00	69,27	$y=0,068x+33,99$ $r = 0,9931$	234,64
R3	42,96	47,26	52,62	60,54	69,15	$y=0,066x+34,81$ $r = 0,9896$	231,38
R4	42,37	47,03	53,20	60,42	68,92	$y=0,066x+34,45$ $r = 0,9938$	233,98
R5	42,84	47,15	53,08	60,88	68,68	$y=0,065x+34,90$ $r = 0,9931$	230,78
Rata – Rata ES <sub>50</sub>							233,45
SD							2,354
CV (%)							1,008

**Gambar 2.** Kurva linier konsentrasi asam galat dan fraksi etil asetat dengan % penangkapan radikal DPPH

Dari persamaan regresi linier (Tabel I dan II), diperoleh nilai rata-rata ES<sub>50</sub> asam galat sebesar  $(2,186 \pm 0,014)$  µg/ml dan nilai rata-rata ES<sub>50</sub> fraksi etil asetat daun murbei hitam sebesar  $(233,45 \pm 2,354)$  µg/ml, hal ini berarti untuk menangkap radikal bebas sebesar 50% diperlukan konsentrasi asam galat sebesar  $2,186 \pm 0,014$  µg/ml, sedangkan konsentrasi fraksi etil asetat daun murbei hitam yang diperlukan sebesar  $233,45 \pm 2,354$  µg/ml. semakin kecil nilai ES<sub>50</sub>, maka sampel uji memiliki keefektifan sebagai antioksidan baik.

Aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat daun murbei hitam kemudian dibandingkan dengan potensi antioksidan dari standar asam galat. Perbandingan aktivitas antioksidan diperlukan untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan dari pembanding asam galat dan larutan uji, dari kedua larutan tersebut yang mana memberikan potensi aktivitas antioksidan yang lebih baik.

Hasil uji distribusi normal dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dengan nilai signifikansi  $0,231 > 0,05$ . Sedangkan hasil uji homogenitas dengan uji *One Way Anova* diperoleh signifikansi  $0,003 < 0,05$  yang berarti bahwa varian data tersebut tidak homogen. Berdasarkan kedua hasil uji tersebut diperoleh data yang terdistribusi normal dan varian data tidak homogen sehingga perlu digunakan metode statistik non-parametrik karena salah satu hasil uji tidak memenuhi syarat.

Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu uji non-parametrik menggunakan metode Uji *Kruskal-Wallis* dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji diperoleh nilai sig.  $0,009 < 0,05$  yang dapat disimpulkan data berbagai kelompok tersebut terdapat perbedaan yang bermakna. Kemudian dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk uji lanjutan antar kelompok larutan uji. Pada uji *Mann-Whitney* didapatkan nilai signifikansi  $0,009 < 0,05$  yang berarti bahwa antara ES<sub>50</sub> asam galat dan fraksi etil asetat daun murbei hitam berbeda bermakna. Berdasarkan hasil uji statistik tersebut, menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan asam galat lebih kuat daripada fraksi etil asetat daun murbei hitam.


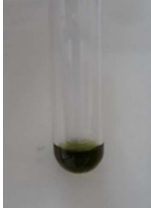




## **G. Penetapan Kandungan Fenol Total**

### **a. Uji kualitatif Fenol**

(Setiabudi & Tukiran, 2017) senyawa yang mengandung positif fenolik akan berubah menjadi warna merah, hijau, ungu, biru atau hitam pekat. Maka dapat disimpulkan bahwa larutan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa golongan fenol. Perubahan warna terjadi karena adanya pembentukan senyawa kompleks antara senyawa fenol dengan ferri klorida ( $\text{FeCl}_3$ ).

Dari hasil diketahui asam galat sebagai kontrol positif mengalami perubahan warna dari jernih menjadi hijau setelah ditetesi dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  1%, begitu juga dengan fraksi etil asetat berubah warna menjadi hijau pekat. Sedangkan etanol sebagai kontrol negatif mengalami perubahan warna dari jernih menjadi kuning setelah ditetesi dengan  $\text{FeCl}_3$  1% yang menandakan bahwa larutan tidak mengandung senyawa fenol.

**Tabel III.** Hasil uji kualitatif senyawa fenol

Sampel	Sebelum FeCl <sub>3</sub> 1%	ditetesi Setelah ditetesi FeCl <sub>3</sub> 1%	Keterangan hasil
Larutan Asam Galat			Hasil positif fenol terbentuk warna hijau
Larutan fraksi etil asetat			Hasil positif fenol terbentuk warna hijau
Larutan etanol			Hasil Negatif terbentuk warna kuning

**b. Uji kuantitatif fenol**

Metode *Follin-ciocalteu* dipilih karena reagen *Follin* akan membentuk larutan berwarna yang dapat diukur serapan maksimalnya pada panjang gelombang 730 nm (Anonim, 2011). Asam galat digunakan sebagai pembanding karena termasuk dalam senyawa golongan fenol, reagen *Follin-Ciocalteu* akan membentuk senyawa molibdenum tungstat dengan senyawa fenolat. Seri konsentrasi asam galat yang digunakan adalah 30,40,50,60,70, dan 80 µg/ml.

Pereaksi *Follin ciocalteu* akan mengoksidasi fenolat (garam alkali atau gugus fenolik-hidroksi) mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) sehingga menjadi molibdenum tungstat. Reaksi ini terjadi pada suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenol menjadi fenolat, untuk membuat suasana basa maka ditambahkan NaOH 10%. Kompleks warna yang terbentuk pada reaksi tersebut terjadi warna biru yang semakin pekat seiring dengan semakin banyaknya ion fenolat yang mereduksi asam heteropoli (Alfian & Susanti, 2012).

### 1. Penentuan *Operating Time* (OT)

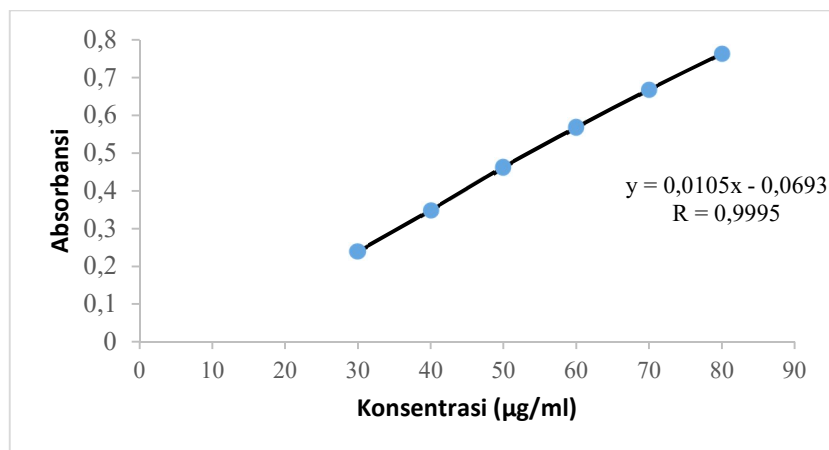
Hasil pengukuran OT pada larutan asam galat konsentrasi 50 µg/ml didapatkan pada menit ke 60-63. Waktu operasional yang didapatkan pada penelitian ini diambil pada absorbansi yang stabil sehingga dipilih OT pada menit ke 60-63.

### 2. Penentuan panjang gelombang serapan maksimal

Panjang gelombang serapan maksimum yang digunakan adalah panjang gelombang asam galat karena digunakan senyawa pembanding asam galat. Panjang gelombang serapan maksimum yang didapat yaitu pada panjang gelombang 735 nm.

### 3. Pembuatan kurva baku asam galat

Pengukuran kurva baku asam galat dan sampel fraksi etil asetat daun murbei hitam dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum dan waktu operasional yang telah didapat. Asam galat dipilih sebagai senyawa pembanding karena asam galat merupakan turunan dari asam hidroksi benzoat yang tergolong asam fenol sederhana. Kandungan fenol asam organik ini bersifat murni dan stabil (Lee *et al.*, 2003). Struktur asam galat memiliki 3 gugus OH yang dapat menangkap radikal bebas dan telah diketahui mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi (Widyaningsih, 2016).



**Gambar 3.** Kurva linier konsentrasi asam galat dengan absorbansi

Berdasarkan data di atas diperoleh persamaan regresi linier  $y = 0,0105x - 0,0693$  dengan nilai R hitung 0,9995. Menurut uji statistik R tabel dengan  $n = 6$  pada taraf kepercayaan 95% diketahui harga R tabel = 0,7067 sehingga R hitung pada persamaan regresi linier lebih besar dari R tabel, dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan signifikan antara konsentrasi larutan standar asam galat dengan absorbansi dan persamaan regresi linier, sehingga kurva persamaan regresi linier dapat digunakan untuk menghitung kadar fenol total dari sampel (Asmahanie, 2017).

### 4. Pengukuran kadar fenol total

Pengukuran kadar fenol dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa fenol pada sampel secara keseluruhan. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel, pengukuran didasarkan adanya gugus kromofor pada

senyawa fenolik yang dapat menyerap cahaya monokromatis. Kandungan fenolik total dalam tumbuhan dinyatakan dalam GAE (*Gallic Acid Equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan miligram asam galat dalam 1 gram sample (Lee *et al*, 2013). Pengukuran kadar fenol total dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan.

**Tabel IV.** Hasil Pengukuran Kadar Fenol Total

Replikasi	Bobot (mg)	Absorbansi	Volume (ml)	fp	Kadar (mg GAE/g)
1	100,2	0,532	10	2,5	14,30
2	100,1	0,540	10	2,5	14,49
3	100,2	0,535	10	2,5	14,37
4	100,3	0,533	10	2,5	14,31
5	100,2	0,531	10	2,5	14,27
Kadar rata-rata (mg GAE/g fraksi)					14,35
SD					0,09
CV					0,006

Berdasarkan data Tabel IV diketahui bahwa fraksi etil asetat daun murbei hitam yaitu sebesar  $14,35 \pm 0,09$  mg GAE/g fraksi dan diketahui nilai CV dari masing-masing sampel kurang dari 5%, dapat diartikan homogenitas dari data tersebut memenuhi syarat.

Aktivitas antioksidan pada daun murbei hitam ini disebabkan oleh adanya senyawa fenol yang dapat menangkalkan senyawa radikal bebas DPPH. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun murbei hitam pada penelitian ini memiliki kekuatan sedang yaitu  $233,45 \pm 2,354$   $\mu\text{g/ml}$ , hal ini dikarenakan kadar fenol total dalam fraksi etil asetat daun murbei hitam pada penelitian ini memiliki kadar yang rendah yaitu  $14,35 \pm 0,09$  mg GAE/g fraksi.

Menurut Sivaci dan Duman (2014), terdapat korelasi positif antara kandungan fenol total dengan aktivitas antioksidan ( $ES_{50}$ ), yaitu semakin banyak senyawa fenol dalam suatu ekstrak, maka aktivitas antioksidan semakin tinggi ditunjukkan dengan nilai  $ES_{50}$  semakin kecil. Hasil penetapan kandungan fenol total dalam fraksi etil asetat daun murbei hitam adalah  $14,35 \pm 0,09$  mg GAE/ g fraksi dan nilai  $ES_{50}$  ( $233,45 \pm 2,354$   $\mu\text{g/ml}$ ), hal ini sudah sesuai dengan teori, aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun murbei hitam tergolong sedang, karena senyawa fenol yang terkandung hanya sedikit.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Fraksi etil asetat daun murbei hitam memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH dengan nilai  $ES_{50}$  sebesar  $233,45 \pm 2,354$   $\mu\text{g/mL}$ . Asam galat sebagai pembanding memiliki nilai  $ES_{50}$  sebesar  $2,18 \pm 0,014$   $\mu\text{g/ml}$ . Berdasarkan metode DPPH asam galat memiliki potensi aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan fraksi etil asetat daun murbei hitam. Kadar fenol total yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun murbei hitam sebesar  $14,35 \pm 0,09$  mg GAE/g fraksi.

## B. SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi senyawa aktif yang terdapat dalam daun murbei hitam untuk dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode lainnya dan dapat dibuat dalam suatu formula produk tertentu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alfian, R., & Susanti, H, 2012, Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus Sabdariffa* Linn) Dengan Variasi Tempat Tumbuh Secara Spektrofotometri, *Pharmaciana*, 2(1).
- Anonim, 2000, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim, 2011, *Quality Control Methods for Herbal Materials*, WHO Press, Switzerland.
- Anonim, 2011b, *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia*, Jilid I, Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.
- Arfan, M., Khan, R., Rybarczyk, A., & Amarowicz, R, 2012, Antioxidant activity of mulberry fruit extracts, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2472–2480.
- Asmahanie, D, 2017, Penetapan Kadar Fenol Total Daun *Bauhinia purpurea* L. Dengan Metode DPPH, *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Hernani, & Raharjo, M, 2005, *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*, Cetakan I, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Lee, J. H., Park, K. H., Lee, M. H., Kim, H. T., & Seo, W. D., 2013, Identification, Characterisation, and Quantification of Phenolic Compounds in The Antioxidant Activity-Containing Fraction From The Seeds of Korean Perilla (*Perilla frutescens*) Cultivars, *Food Chemistry*, 136(2), 843–852.
- Molyneux, P, 2004, The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Salamah, N., & Widyasari, E, 2015, Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria longan* ( L ) Steud.) Dengan Metode Penangkapan Radikal 2 , 2 ' Diphenyl-1-Picrylhydrazyl, *Pharmaciana*, 5(1), 25–34.
- Sánchez-Salcedo, E., Mena, P., García-Viguera, C., Hernández, F., & Martinez, J, 2015, (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals, *Journal of Functional Food*, 18(1), 1039–1046.
- Setiabudi, D. A., & Tukiran, 2017, Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Klampok Watu (*Syzgium litorale*), *UNESA Journal of*



*Chemistry*, 6(3).

- Souza, G. R., Diniz, T. C., Branco, A., Oliveira, A. P., Pacheco, A. G. M., Silva, M. G., Almeida, J, 2018, Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L .(Moraceae ), *Brazilian Journal Biology*, 78(2), 248–254.
- Sunarni, T. (2005). Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa Kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 2(2), 53–61.
- Widyaningsih, E., 2016, Penentuan Kadar Senyawa Flavonoid Total dan Fenolik Total Serta Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Kenikir (*Cosmos caudatus Kunth*), *Skripsi*, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Yiğit, D., Mavi, A., & Aktaş, M., 2008, Antioxidant activities of black mulberry (*Morus nigra*), *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(2), 223–232.